

聚乙二醇硬脂酸酯 15 对 黄芩苷角膜透过性研究*

张 锐,赵海南,瞿继兰,李 琳,李 楠,刘志东

摘要:[目的]研究聚乙二醇硬脂酸酯 15(Sol)对黄芩苷离体角膜透过率的影响,探讨其在眼用制剂中的应用。[方法]采用离体角膜渗透技术考察不同质量浓度的 Sol 对黄芩苷角膜透过率的影响。[结果]0.4%和 0.8%的 Sol 使黄芩苷的表观渗透系数分别增加了 2.05 倍和 1.65 倍,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$),而 0.2%、1.0%和 2.0%的 Sol 未能显著增大黄芩苷的表观渗透系数($P>0.05$)。[结论]0.4%和 0.8%的 Sol 能够显著增大 Sol 的表观渗透系数,且对角膜无刺激性。

关键词:聚乙二醇硬脂酸酯 15;角膜透过性;黄芩苷

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1673-9043(2013)01-0036-04

在临床上,黄芩苷对眼科疾病如角膜炎、结膜炎的治疗作用已经得到广泛肯定,对眼科常见的病原菌也均有很强的抑菌杀菌作用。目前国内已经上市黄芩苷眼用制剂主要为滴眼液,但是由于黄芩苷的理化性质以及滴眼液本身存在的剂型缺点,黄芩苷滴入眼部后会大量流失,从而造成药效的维持时间较短,生物利用度较低。另外,角膜是呈弧形的透明生物膜,对外源性异物具有屏障作用,由于其上皮渗透性较差,成为影响眼用制剂吸收的主要因素。所以,改善角膜透过性,增加药物的跨膜吸收,提高药物的生物利用度成为眼用制剂面临的主要问题。目前解决的方法主要是应用渗透促进剂,如聚乙二醇硬脂酸酯 15(SolutolHS 15,Sol),一种聚乙二醇-12-羟基硬脂酸酯,低毒非离子表面活性剂,已经被应用于经皮和口服给药系统。

本文的模型药物为黄芩苷,考察了渗透促进剂 Sol 对黄芩苷角膜透过率的影响,并探讨了其作用机制,从而明确 Sol 作为一种新型的渗透促进剂在

眼部给药系统的应用前景。

1 仪器和试剂

改良 Franz 扩散池(上海锺凯科技贸易有限公司),TK-20A 型透皮扩散试验仪(上海锺凯科技贸易有限公司),AX205 电子天平(Mettler Toledo,瑞士),Milli-Q 超纯水系统(Millipore,美国),SPD-10Avp 岛津高效液相色谱仪(HPLC)(Shimadzu,日本),AT-130 柱温箱(大连中汇达科学仪器有限公司)。黄芩苷原料药(天津中新药业,含量 $>90\%$),黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所),聚乙二醇硬脂酸酯 15(北京凤礼精求商贸有限公司),其他试剂均为分析纯。

白色家兔,雌雄兼用,体质量 2.0~2.5 kg,由北京沙河通利实验动物养殖场提供,合格证号:SLXK 京 2010-0004。

2 实验方法与结果

2.1 实验装置 本实验采用改良的 Franz 立式扩散池,它由两个内径大小相同的供给池和接受池组成,供给池的容积为 0.5 mL,接受池的容积为 4.5 mL,内半径为 0.4 cm,有效的扩散面积为 0.50 cm²。

2.2 样品溶液的配制

2.2.1 空白溶液的配制 精密称取黄芩苷 0.1 g,充分溶解于 100 mL 的新鲜 pH 6.5 磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,得黄芩苷 pH 6.5 PBS 溶液,作为空白对照溶液。

2.2.2 0.2%~2.0% Sol 溶液的配制 分别称取适量 Sol 加入新配制的 10 mL 空白对照溶液中,得到所

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81001645);中国博士后科学基金项目(20090460701)。

作者单位:300193 天津中医药大学,天津市现代中药重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地;现代中药发现与制剂技术教育部工程研究中心

作者简介:张 锐(1986—),男,硕士研究生,主要从事缓控释制剂的研究。

通讯作者:刘志东,E-mail:lonerliuzd@163.com。

需的不同浓度的 Sol 黄芩苷 pH 6.5 PBS 溶液。

2.3 离体角膜透过实验 将家兔耳缘静脉注射空气致死,在致死后的 20 min 内,用眼科手术剪和镊子小心分离出角膜,并除去虹膜、巩膜、睫状体等多余的眼部组织,然后将离体的新鲜角膜小心的放在已放入搅拌子的接受池和供给池的中间,确定角膜的上皮层面向供给池之后,固定角膜,最后在接受池中加入 4.5 mL 新鲜配制的 pH 6.5 PBS 溶液,在供给池中加入 0.5 mL 不同药物浓度的 Sol 溶液,并将供给池用保鲜膜密封。

装置置于透皮扩散实验仪中,温度控制在 37℃。实验开始之后,分别于 40、80、120、160、200、240 min 从接受池中溶液全部取出,同时分别补充同温等体积的 pH 6.5 PBS 溶液 4.5 mL,样品经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,取样 20 μL,作 HPLC 分析。

2.4 数据处理 单位面积累积透过量 Q 计算公式如下:

$$Q_n = V_0 = (C_n + \frac{V}{V_0} \sum_{i=3}^{n-1} C_i) = V_0 C_n + V \sum_{i=1}^{n-1} C_i$$

其中: C_n 为 t 时间药物的测定浓度; C_i 为 t 时间前的测定浓度; V_0 为接受池中溶液体积; V 为取样体积。

表观渗透系数 (P_{app} , cm/s) 计算公式如下:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \cdot C_0 \cdot A \cdot 3.600}$$

其中: C_0 为供给池初始药物浓度; A 为有效透过面积; $\Delta Q/\Delta t$ 可由累积透过量—时间曲线稳态部分的斜率求得。

表观渗透系数及稳态流量均以单因素方差分析进行统计学分析。

稳态流量 J_{ss} 计算公式如下:

$$J_{ss} = C_0 \cdot P_{app}$$

2.5 角膜水化值的测定 角膜水化值是体外评价物质对角膜组织刺激性的重要指标,本实验以水化值考察促渗剂 Sol 对兔眼角膜的损伤。

角膜水化值 (H) 计算公式如下:

$$H\% = \frac{m_b - m_a}{m_b} \times 100$$

其中, m_b 为体外实验后暴露于扩散介质的角膜区域的角膜质量; m_a 为 60℃ 干燥 16 h 后再次称质量的角膜质量。

2.6 样品测定

2.6.1 色谱条件 参照文献[1-2],黄芩苷色谱条件为色谱柱: Diamond DIKMAODS-C₁₈; 流动相: 甲醇:

水:磷酸 (60:40:0.05); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 35℃。

2.6.2 专属性考察 分别取空白角膜溶出物及含药角膜溶出物的 pH 6.5 PBS 各 20 μL, 作高效液相色谱 (HPLC) 分析, 记录色谱图。如图 1、图 2 所示, 空白角膜溶出物不干扰药物的 HPLC 测定。

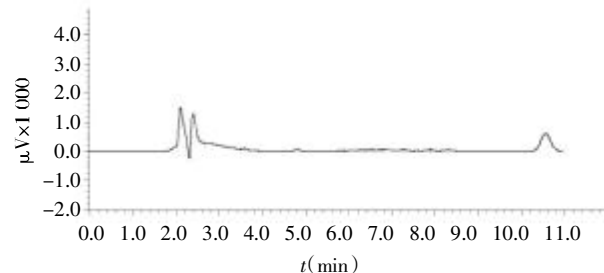


图 1 空白角膜溶出物色谱图

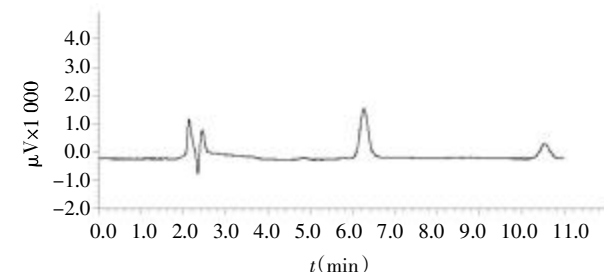


图 2 含黄芩苷角膜溶出物色谱图

2.6.3 标准曲线的制备 精密配制浓度为 0.021 1~0.738 5 μg/mL 的黄芩苷 pH 6.5 PBS 溶液,进样 20 μL,记录峰面积。直线回归方程: $A = 562.52 \times C - 459.01$, $r^2 = 0.9999$,线性范围为 0.021 1~0.738 5 μg/mL,如图 3 所示,样品质量浓度与峰面积的线性关系良好。在此范围内配制高、中、低 3 个质量浓度的黄芩苷 pH 6.5 PBS 溶液 0.105 5、0.316 5、0.422 μg/mL,测得日内精密度 RSD 分别为 0.32%、0.12%、0.21%,日间精密度 RSD 分别为 0.55%、0.15%、0.19%,说明仪器精密度良好。

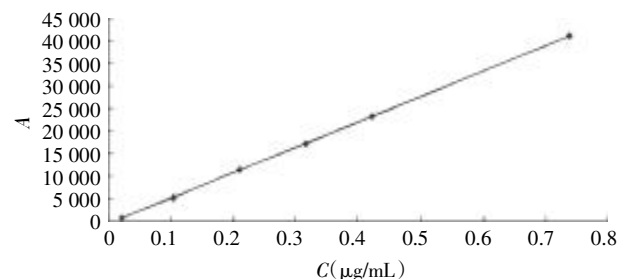


图 3 PBS 溶液中黄芩苷回归直线

2.7 结果 本实验以黄芩苷 pH 6.5 PBS 溶液为对照,分别考察了 0.2%、0.4%、0.8%、1.0%和 2.0%的 Sol 为促渗剂时黄芩苷的角膜透过性。黄芩苷离体

角膜透过参数见表1、表2,角膜透过曲线图见图4, Sol 对角膜水化值的影响见表3。

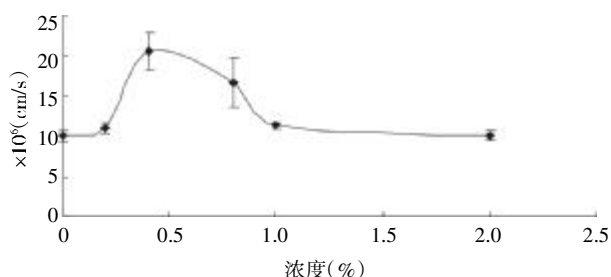


图4 Sol 对黄芩苷离体角膜透过率的影响

如图4所示,黄芩苷的表观渗透系数随着Sol浓度的升高而逐渐升高,而达到最大值之后,又随着Sol浓度的继续升高而逐渐减小。Sol的浓度为0.4%、0.8%时,黄芩苷的表观渗透系数分别增加了2.05倍、1.65倍,与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

正常的角膜水化值为76%~80%,超过83%即可判定角膜受到一定程度的损伤^[3]。据文献报道^[4],Sol具有较高的生理耐受性,体积分数低于10%对兔眼角膜没有刺激性。另刘睿等^[5]实验过程中0.1%~1.0%的Sol对角膜无刺激性,因此本实验对此范围的体积分数进行了主要考察。由表3可知,本实验中含不同浓度Sol的黄芩苷溶液对角膜水化值没有

显著影响,表明实验过程中角膜上皮细胞和内皮细胞没有被损伤。

3 讨论

本实验选用pH 6.5 PBS溶液做为扩散介质,主要因为黄芩苷为弱酸性化合物,因此其在碱性溶液中降解迅速,在偏酸性的溶液中稳定性相对较好。GBR液是一种生理溶液,其能保存离体角膜达6h,因此在体外角膜透过实验中多采用此溶液,但因GBR液呈碱性,黄芩苷在此溶液中极不稳定,因而最终舍弃。最终选择与生理环境相近且稳定性较好的pH 6.5 PBS溶液作为体外角膜透过的接收液。

刘睿等^[5]实验结果阐述了Sol增加角膜透过量的可能机制,由于Sol在角膜上皮细胞的磷脂双层中形成胶束,然后将细胞中的磷脂消除,从而达到增加药物角膜透过量的作用。另有研究表明^[6-10],Sol促进药物在黏膜的吸收作用机制是使细胞膜上的磷脂双分子层运动更加有序,增加了膜的通透性,从而利于药物的吸收。本实验结果发现,Sol显著增加了药物的角膜透过,并且具有浓度依赖性,0.4%和0.8%的Sol使黄芩苷的表观渗透系数分别增加了2.05倍和1.65倍,与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$),且对角膜无刺激性。表明一定浓度的Sol可显著提高黄芩苷的角膜透过率,且对角膜无刺激性,因此Sol作为一种新型的渗透促进剂在

表1 不同浓度Sol对黄芩苷离体角膜累积透过量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Sol 浓度 (%)	药物的累积透过量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)						线性关系	r^2
	40 min	80 min	120 min	160 min	200 min	240 min		
0	0.176 1±0.077 6	0.518 0±0.049 2	1.054 1±0.055 5	1.842 0±0.148 6	2.756 2±0.117 9	3.763 3±0.178 6	$Q=0.018 2 t-0.858 9$	0.970 2
0.2	0.255 9±0.097 2	0.747 8±0.144 6	1.421 3±0.210 3	2.300 2±0.104 5	3.191 7±0.084 3	4.177 6±0.184 1	$Q=0.019 9 t-0.766 2$	0.987 5
0.4	0.209 9±0.028 0	1.042 3±0.230 2	2.269 4±0.404 0	3.812 8±0.568 0	5.480 7±0.672 7	7.616 5±0.941 0	$Q=0.037 1 t-1.783 9$	0.979 0
0.8	0.335 3±0.083 6	1.028 1±0.078 3	2.010 7±0.061 4	3.310 5±0.467 4	4.806 8±0.786 0	6.249 8±0.917 5	$Q=0.030 1 t-1.263 9$	0.983 5
1.0	0.130 7±0.053 1	0.501 3±0.063 5	1.271 6±0.129 8	2.151 2±0.187 7	3.097 4±0.151 2	4.173 3±0.223 8	$Q=0.020 6 t-1.000 6$	0.981 1
2.0	0.078 6±0.018 7	0.552 8±0.058 6	1.189 3±0.033 0	1.988 2±0.026 7	2.896 7±0.137 1	3.604 2±0.123 2	$Q=0.018 2 t-0.827 6$	0.990 8

表2 不同浓度Sol对黄芩苷离体角膜透过参数的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

测定项目	0	0.2	0.4	0.8	1.0	2.0
$P_{app} \times 10^6 (\text{cm}/\text{s})$	10.03±0.75	11.03±0.67	20.57±2.42**	16.60±3.08*	11.37±0.43	10.08±0.55
$J_{ss} \times 10^3 [\mu\text{g}/(\text{s}/\text{cm}^2)]$	10.15±0.76	11.08±0.76	20.82±2.44**	16.80±3.11*	11.42±0.34	10.13±0.63

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

表3 Sol对角膜水化值的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

测定项目	0	0.2	0.4	0.8	1.0	2.0
角膜水化值	77.77±1.65	76.06±0.34	82.62±0.84	78.23±2.76	79.29±1.94	81.70±1.32

眼部给药系统中可被广泛应用。

参考文献:

- [1] 崔佳,鲁燕侠,仝青英.感咳清颗粒中黄芩苷的含量测定[J].中国中药杂志,2003,28(5):462-463.
- [2] 张欣华,刘志东,张伯礼,等.羟丙基- β -环糊精对黄芩苷角膜透过性研究[J].天津中医药大学学报,2008,25(6):506-508.
- [3] Saettone M F, Chetom P, Cerbai R, et al. Evaluation of ocular permeation enhancers; in vitor effects on corneal transport of four blockers, and in vitro/in vivo toxic activity[J]. Int J Pharm, 1996, 142(1): 103-113
- [4] Jim Jiao. Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60: 1663.
- [5] 刘睿,刘志东,舒乐新,等.3种渗透促进剂对芒果苷离体角膜透过率的影响[J].中国中药杂志,2010,35(23):3131-3134.
- [6] 周庄,林绍彬. Solutol HS15对黄豆苷元小肠吸收促进作用的研究[J].福建中医药大学学报,2011,42(1):50-51.
- [7] 张密霞,李越,杜嵘,等.黄芩苷对体外培养神经干细胞分化的影响[J].天津中医药大学学报,2007,26(4):199-201.
- [8] 李越,杜嵘,张艳军.高效液相色谱法测定人参皂苷Rg1与黄芩苷在细胞培养基中的含量变化[J].天津中医药,2006,23(2):160-162.
- [9] 汪丽娅,张占军,王忠,等.黄芩苷对脑缺血大鼠的治疗作用及对Capase-3的影响[J].天津中医药,2006,23(2):143-146.
- [10] 赵净,宋西卫,刘志东.不同促渗剂对黄芩离体鼠皮透过行为的影响[J].天津中医药,2009,25(5):423-425.

(收稿日期:2012-12-15)

Investigation on corneal permeability for Baicalin of SolutolHS 15 *in vitro*

ZHANG Rui, ZHAO Hai-nan, QU Ji-lan, LI Lin, LI Nan, LIU Zhi-dong

(Tianjin University of TCM, Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese

Medicine, Ministry of Education, Engineering Research Center of Modern Chinese Medicine

Discovery and Preparation Technique, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of SolutolHS 15 (Sol) on corneal preparation rate and to explore their use in ophthalmology. [Methods] The effects of Sol on the corneal permeability for Baicalin were investigated *in vitro* with isolated corneas of rabbit. [Results] The 0.4% and 0.8% Sol could increase the appeared permeability for Baicalin as much as 2.05 and 1.65 times respectively when compared with the permeability in control ($P < 0.05$). However, 0.2%, 1.0% and 2.0% Sol could not improve the appeared permeability for Baicalin ($P > 0.05$). [Conclusion] The 0.4% and 0.8% Sol can enhance the corneal appeared permeability for Baicalin significantly and have not irritation on eye tissues.

Key words: SolutolHS 15; corneal permeability; Baicalin